

SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE PATÓGENOS MASTITOGÉNICOS AISLADOS EN LECHE DE VACAS DOBLE PROPÓSITO*

Antimicrobial sensitivity of mastitogenic pathogens isolated from milk of dual purpose cows

Freddy Gutiérrez¹, Milagros Díaz¹, Yumaris Arias¹ y Eligio Rodríguez¹

RESUMEN

La investigación se realizó en diferentes unidades de producción del municipio Guanare del estado Portuguesa, durante febrero y marzo de 2013. El objetivo fue clasificar los patógenos mastitogénicos aislados en leche de vacas doble propósito y determinar la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos. Se recolectaron por muestreo intencional y asepticamente 45 muestras de leche cruda directamente del pezón, con resultados de california mastitis test (CMT) desde trazas hasta 3 cruces. Los aislamientos se realizaron con las instrucciones recomendadas por el National Mastitis Council. La sensibilidad y la resistencia se determinaron por el método de difusión del disco en agar nutritivo siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Se utilizaron 13 sensibilizadores antimicrobianos: cefalotina 30ug, cloramfenicol 30ug, clindamicina 2ug, eritromicina 15ug, kanamicina 30ug, lincomicina 2ug, penicilina 10ug, tetraciclina 30ug, vancomicina 30ug, sulfamethoxazole-trimethoprin SXT, rifampin 5ug, tobramicina 10 ug y neomicina 5mcg. Un total de 45 cepas de patógenos fueron aisladas, 29 *Staphylococcus aureus*, 11 *Staphylococcus epidermidis*, 3 *Bacillus sp.*, 1 *Acinetobacter sp.* y 1 *Arcanobacterium pyogenes*. La cepa más resistente fue *Arcanobacterium pyogenes* seguida de *Acinetobacter* y *Bacillus sp.*; mientras que las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* mostraron sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos probados.

Palabras clave: mastitis bovina, antibiograma, resistencia, *Staphylococcus sp.*

ABSTRACT

The investigation was carried out in different units of production of the Guanare Municipality, Portuguesa State, during February and March 2013. The objective was to classify mastitogenic pathogens isolated in milk dual purpose cows and to determine the antimicrobial sensibility. 45 samples were collected directly of the stem by purposive sampling and aseptically, with results of California mastitis test from traces to 3 crosses. The isolations were carried out according with the instructions recommended for the National Mastitis Council. The sensibility and the resistance were decided for the diffusion method the disk in nutritious agar following the lineaments of the Institute of Clinical Standards and Laboratory. Antimicrobial sensidiscs: cephalothin 30ug, chloramphenicol 30ug, clindamycin 2ug, erythromycin 15ug, kanamycin 30ug, lincomycin 2ug, penicillin 10ug, tetracycline 30ug, vancomycin 30ug, sulfamethoxazole-trimethoprin SXT, rifampin 5ug, tobramycin 10 ug and neomycin 5mcg were used. A total of 45 strain of pathogens were isolated, 29 *Staphylococcus aureus*, 11 *Staphylococcus epidermides*, 3 *Bacillus sp.*, 1 *Acinetobacter sp.* and 1 *Arcanobacterium pyogenes*. The more resistant strain was *Arcanobacterium pyogeneses* followed by the *Acinetobacter sp* and *Bacillus sp.*, while that the strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermides* showed sensibilities to most tested antimicrobials.

Key words: bovine mastitis, antibiogram, resistance, *Staphylococcus sp.*

(*) Recibido: 07-10-2013

Aceptado: 29-09-2014

¹ Programa Ciencias del Agro y del Mar. Universidad Ezequiel Zamora, UNELLEZ, Guanare 3350, Po. Venezuela. y_u_maris@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La inflamación de la glándula mamaria comúnmente conocida como mastitis es una enfermedad compleja por su etiología, patogenicidad, intensidad, duración y secuelas. La mastitis clínica se caracteriza por inflamación, rubor, calor, dolor y pérdida parcial de la función de los cuartos o la glándula mamaria y en la leche se observa la presencia de coágulos o grumos y su color se torna amarillo o rojizo por la presencia de pus o de sangre; en casos severos hay aumento de la temperatura corporal y del pulso, decaimiento, pérdida del apetito y baja de la producción. La forma subclínica se caracteriza por la ausencia de signos clínicos en la ubre y la apariencia normal de la leche; sin embargo, el recuento de las células somáticas se encuentra aumentado (Radostits *et al.* 2002).

Los patógenos causantes de mastitis pueden ser clasificados, desde el punto de vista epidemiológico, en tres grandes grupos, de acuerdo a su origen y forma de difundir en el rebaño lechero (Scaramelli 1999; Chávez *et al.* 2000; Gentilini *et al.* 2002)

1.-Patógenos contagiosos: La fuente de infección son los cuartos de ubre infectados; su transmisión ocurre durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, paños de secado o pezoneras. En este grupo se ubican: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.* y en ocasiones, *Streptococcus dysgalactiae*, aunque este último puede tener origen ambiental.

2.-Patógenos ambientales: La fuente de infección es el ambiente como la cama de paja o aserrín, agua estancada, tierra, también pueden encontrarse en la piel (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores del animal. La infección ocurre en cualquier momento, pero es frecuente en el período que sigue al ordeño, durante el periodo seco o descanso y durante los días posteriores al parto. En este grupo se incluyen: *Streptococcus uberis* y otros estreptococos (a excepción de *Streptococcus agalactiae*), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, levaduras, *Prototheca zooffi*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp.*, y otros microorganismos que viven en el ambiente de la vaca. El grado de infección de estas bacterias tiende a incrementarse cuando las

condiciones favorecen su crecimiento especialmente en época de lluvia.

3.-Patógenos oportunistas: La fuente más importante de estos microorganismos es la piel sana de la ubre y los pezones y manos del ordeñador. La frecuencia de infección por estos agentes es mayor durante el periodo de reposo o seco, durante el cual la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección de pezones post-ordeño. La frecuencia de infecciones causadas por estos microorganismos es elevada para el momento del parto, pero disminuye drásticamente durante la lactación. Raramente generan casos clínicos, y si surgen suelen ser moderados. Pueden infectar a novillas en su primer parto. La mayoría de las infecciones se curan espontáneamente. En este grupo se incluyen: *Staphylococcus hycus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. xilosus*, *S. simulans* y otras especies de *Staphylococcus* distintas a *Staphylococcus aureus*; probablemente, algunos estreptococos, podrían ubicarse en esta categoría.

La mastitis bovina es una de las enfermedades que ocasiona más gastos a la ganadería venezolana y del mundo, causa grandes pérdidas que limitan la productividad de los rebaños lecheros, determinadas por subproductividad de los cuartos infectados, reducción de la producción de leche, leche mastítica que debe descartarse, gastos por concepto de medicina y aumento de los costos por utilización de mano de obra especializada en el tratamiento de la infección. En EUA se estima que el costo por año causado por la enfermedad es de 1,2 a 1,7 billones de dólares, con pérdida anual por vaca de 184 dólares. En Colombia se calculan 41.580 pesos diarios, por la presencia de mastitis subclínica (Restrepo *et al.* 2012).

El uso indiscriminado de antibióticos en algunos países ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos, las cuales han sido aisladas de leche procedente de glándulas mamarias con mastitis (Gentilini *et al.* 2000; Kaszanyitzk *et al.* 2003). Esta resistencia trae como consecuencia dos aspectos importantes, el primero, una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y el segundo, la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través

de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda (Tikofsky *et al.* 2006).

La identificación de los agentes causales es importante, por cuanto son indicadores de los factores predisponentes existentes en las explotaciones lecheras, permite la toma de decisiones en el diseño de programas de control, es una herramienta útil para evaluar la efectividad de las medidas tomadas y permite seleccionar la terapéutica sobre bases más firmes (Scaramelli 1999). El objetivo del trabajo fue clasificar patógenos mastitogénicos aislados en leche de vacas doble propósito, en el municipio Guanare, estado Portuguesa y determinar la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagnóstico de mastitis

Se utilizó la prueba CMT para el diagnóstico, esta prueba permite estimar la existencia de la enfermedad en forma subclínica y conocer aproximadamente su nivel de gravedad (Bedolla y Castañeda 2007). Para aislar el tipo de microorganismo se asumió como mastitis subclínica los niveles de CMT desde una cruz (+), hasta tres cruces (+++).

Obtención de la muestra

Las cepas de bacterias mastitogénicas estudiadas fueron aisladas a partir de muestras de leche de vacas doble propósito con mastitis, ubicadas en cuatro unidades de producción del municipio Guanare estado Portuguesa, durante el período no lluvioso de 2013 (febrero y marzo). Se recolectaron 45 muestras con grado de mastitis desde trazas hasta tres cruces y con signos y síntomas clínicos de mastitis clínica y crónica. Cada unidad de producción fue visitada una vez, durante el ordeño vespertino y luego de aplicada la prueba de CMT fueron muestreados 10 ml de leche por cuarto. Antes de la toma de muestras, los pezones fueron desinfectados con alcohol 100%, secados con papel absorbente y el primer chorro de leche fue descartado en recipientes adecuados (National Mastitis Council, NMC 1999).

Traslado de las muestras, aislamiento e identificación de cepas bacterianas

Las muestras de leche fueron trasladadas en una cava con hielo, hasta al laboratorio de microbiología de la UNELLEZ-Guanare. La siembra, aislamiento e identificación de patógenos se realizó según MacFaddin (2003). Se sembró por agotamiento en medios de agar sangre, agar nutritivo, agar KF y agar Macconkey. Se incubó en jarras GaspaK por 48 horas a una temperatura de 37° C. Después de este periodo se observó cada medio para determinar la presencia o ausencia de colonia de microorganismos, en las placas con crecimiento se realizó la coloración Gram para una primera clasificación y luego se realizaron las pruebas según esquemas de identificación bioquímica.

Sensibilidad y resistencia de patógenos

La sensibilidad y la resistencia de patógenos se determinaron por el método de difusión del disco en agar nutritivo para cada una de las bacterias aisladas, de acuerdo con los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2009), se utilizaron 13 agentes antimicrobianos de los más usados en el control y prevención de mastitis. Se escogieron los siguientes sensidiscos: cefalotina 30ug, cloramfenicol 30ug, clindamicina 2ug, eritromicina 15ug, kanamicina 30, lincomicina 2 ug, penicilina10, tetraciclina 30 ug, vancomicina 30ug, sulfamethoxazole-trimethoprin SXT, rifampin 5 ug, tobramicina 10 ug y neomicina 5 mcg.

Cada bacteria se sembró en 5 ml de caldo o infusión cerebro corazón, se incubó por 24 horas a 37°C. Luego la suspensión se sembró con aplicadores estériles en toda la superficie de las placas de petri con 20 ml de agar nutritivo de un grosor de 5 mm, se dejó en reposo por un periodo de 3 minutos antes de colocar los sensidiscos, los cuales estuvieron espaciados de manera que la distancia a la pared de la placa fuese de 15 mm y la distancia entre ellos de 30 mm. Las muestras fueron incubadas a 37° C por un periodo de 24 horas, transcurrido el tiempo se procedió a medir con una regla milimetrada la zona de inhibición de los halos alrededor de los discos. Los resultados fueron analizados según el tamaño del halo que presentó

cada uno de los discos utilizados, clasificados como sensibles, intermedios o resistentes, según escalas estandarizadas por CLSI (2009), mostrados en la Tabla 1.

Análisis estadístico

Los resultados para las variables patógeno aislado y sensibilidad se analizaron mediante la prueba de X^2 de independencia; mientras que para las variables tipo de agente bacteriano aislado y tipo de mastitis se aplicó la prueba de hipótesis para estimación de proporcionalidad, con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación de los agentes bacterianos aislados

1. En el grupo de patógenos contagiosos aislados, en mayor proporción se encontró el *Staphylococcus aureus*, estuvo presente en 41% de los casos de mastitis subclínica, 45% en clínica 14% en crónica ($P < 0,05$) (Fig. 1). Resultados similares fueron obtenidos por Pellegrino *et al.* (2010) quienes informaron que 66,66% de los casos de mastitis subclínica fueron causados por *Staphylococcus aureus* y 33,33% fue causado por otras especies de bacterias.
2. En el grupo de ambientales, se aislaron *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp.* y *Arcanobacterium pyogenes*. Las cepas de *Bacillus sp.* aisladas se encontraron ($P < 0,05$)

en 33,3 % de todos los tipos mastitis (Fig. 1). Las cepas de *Acinetobacter sp.* y *Arcanobacterium pyogenes*, se aislaron en todos los cuartos con mastitis crónica ($P < 0,05$), debido a la posibilidad de mastitis causadas por procesos traumáticos que facilitan la penetración de microorganismos ambientales al interior de los pezones, debido a que conforman parte de la microflora normal del medio ambiente.

3. En el grupo de oportunistas fue aislado *Staphylococcus epidermidis* en mastitis clínica y crónica con incidencia 61 y 39% ($P < 0,05$), respectivamente (Fig. 1). Calderón. (2007), en sistemas especializados reportó que 11,3% de los aislamientos correspondieron a microorganismos oportunistas como *Staphylococcus*.

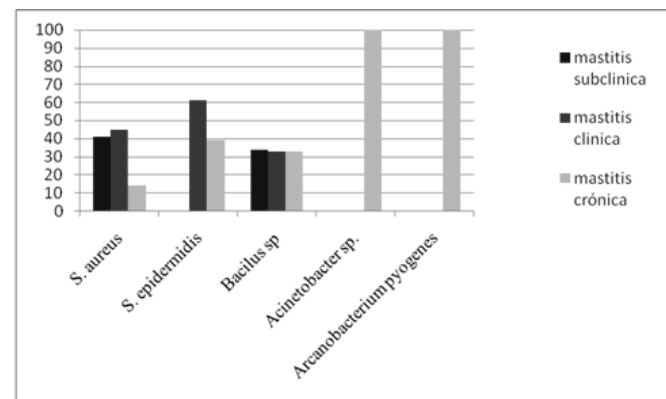


Figura 1. Proporción de microorganismos aislados según tipo de mastitis.

Tabla 1. Interpretación del diámetro de las zonas de inhibición para patógenos bacterianos mastitogénicos.

Antibiótico	Concentración	Zona de inhibición (mm)		
		Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Cefalotina	30ug	≥ 18	15-17	≤14
Cloramfenicol	30ug	≥ 18	13-17	≤12
Clindamicina	2ug	≥ 21	15-20	≤14
Eritromicina	15 ug	≥ 23	14-22	≤13
Kanamicina	30ug	≥ 18	14-17	≤13
Lincomicina	2 ug	≥22	16-21	≤15
Penicilina	10 ug	≥29		≤28
Tetraciclina	30 ug	≥ 19	15-18	≤14
Vancomicina	30ug	≥ 17	15-16	≤14
Sulfamethoxazole trimethoprin SXT		≥ 16	11-15	≤10
Rifampin	5 ug	≥ 20	17-19	≤16
Tobramicina	10 ug	≥ 15	13-14	≤12
Neomicina	5 μg	≥ 17	13-16	≤16

Fuente: CLSI (2009).

Patrón de sensibilidad de agentes mastitogénicos aislados

En la Tabla 2 se presentan las características de sensibilidad. El *S. aureus* fue sensible a cefalotina, tetraciclina, rifampin, cloramfenicol, tobramicina, penicilina, sulfamethoxazol-trimethoprin, kanamicina, clindamicina y vancomicina; mientras que para la eritromicina, lincomicina la sensibilidad fue intermedia y resultó resistente a la neomicina. Estos resultados fueron similares a los informados por Farías *et al.* (2005) y Valero *et al.* (2010), en el estado Zulia, y diferentes a los encontrados por Acuña *et al.* (2008) en Quito, Ecuador, quienes indicaron que la mayoría de patógenos fueron resistentes a la penicilina.

Las cepas de *S. epidermidis* fueron sensibles a cefalotina, tetraciclina, rifampicina, kanamicina, penicilina, cloramfenicol y tobramicina; presentó sensibilidad intermedia a lincomicina y fue resistente a neomicina. Farías *et al.* (2005) reportaron resultados similares en la región del Zulia, informaron que 54,90% de los aislamientos fueron susceptibles a 12 antimicrobianos probados. De manera contraria, Medina (2000), en Guanare Portuguesa, informó que *S. epidermidis* y *S. aureus* fueron resistentes a todos los antibióticos usados en el control y tratamiento de la mastitis.

La cepa de *Bacillus sp.* aislada en el presente ensayo resultó sensible a cloramfenicol, kanamicina, eritromicina y tetraciclina; de sensibilidad intermedia a clindamicina, y resistente a lincomicina, neomicina, cefalotina, penicilina, sulfamethoxazol-trimethoprin y rifampin. Farías *et al.* (2001) citó que *Bacillus sp.* aislado de leche cruda con antimicrobianos fue multiresistente.

Las cepas de *Acinetobacter sp.* mostraron comportamiento diferente, porque solo resultaron sensibles a cloramfenicol, kanamicina, tetraciclina, tobramicina y neomicina, y resistentes a los demás antimicrobianos. El *Arcanobacterium pyogenes* fue sensible a cefalotina, cloramfenicol, tetraciclina y sulfamethoxazol-trimethoprin y resistente al resto de los antibióticos probados, esta especie genera un problema de multiresistencia marcado.

Hubo dependencia entre el tipo de patógeno aislado y la sensibilidad (Tabla 3) de cada uno de ellos frente a los antibióticos probados (P<0,01), lo que indica que cada microorganismo presentó un patrón de sensibilidad diferente.

Tabla 3. Relación entre patógenos mastitogénicos aislados y sensibilidad antibiótica.

	Tipo de patógeno	Sensibilidad
x ²	280,4	67,56
Significancia	** (P<0,01)	** (P<0,01)

Tabla 2. Sensibilidad de las cepas patógenas aisladas en leche mastítica de vacas doble propósito.

Antibiótico	Sensibilidad					Intermedio					Resistencia				
	Patógenos														
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	%														
Cefalotina 30ug	100	100	33	0	100	0	0	0	0	0	1	0	67	100	0
Cloramfenicol 30ug	90	80	100	100	100	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Clindamicina 2ug	72	70	0	0	0	28	30	100	0	0	0	0	0	100	100
Eritromicina 15 ug	45	50	67	0	0	55	40	33	0	0	0	10	0	100	100
Kanamicina - 30 ug	79	90	100	100	0	21	10	0	0	0	0	0	0	0	100
Lincomicina 2 ug	10	10	0	0	0	59	50	0	0	0	0	40	100	100	100
Penicilina 10 ug	83	90	33	0	0	0	0	0	0	0	31	10	67	100	100
Tetraciclina 30 ug	97	100	67	100	100	0	0	0	0	0	17	0	33	0	0
Vancomicina 30ug	45	50	34	0	0	31	30	33	0	0	3	20	33	100	100
Sulfamethoxazole trimethoprin	83	50	33	0	100	14	20	0	0	0	24	30	67	100	0
Rifampin 5 ug	94	100	0	0	0	3	0	33	0	0	3	0	67	100	100
Tobramicina 10 ug	86	80	34	100	0	14	10	33	0	0	3	10	33	0	100
Neomicina 5 mcg	4	20	0	100	0	11	40	0	0	0	0	40	100	0	100

1= *S. aureus*. 2= *S. epidermidis*. 3= *Bacillus sp.*. 4= *Acinetobacter sp.*. 5= *Arcanobacterium pyogenes*

CONCLUSIONES

El patógeno contagioso aislado en mayor proporción fue *Staphylococcus aureus*, causante de mastitis subclínica, clínica y crónica. En el grupo de patógenos ambientales se aislaron *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Arcanobacterium pyogenes*, causantes de mastitis crónica. En el grupo de oportunistas se identificó *Staphylococcus epidermidis* y se relacionó con los caso de mastitis clínica y crónica.

Cada bacteria presentó dependencia con el tipo de mastitis y el patrón de sensibilidad antibiótica. El *S. aureus*, y *S. epidermidis* presentaron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, a diferencia de *Bacillus sp.*, que presentó una menor sensibilidad a la cantidad de antibióticos probados. *Acinetobacter sp.* y *Arcanobacterium pyogenes* fueron los microorganismos menos sensibles.

REFERENCIAS

- Acuña, M., Rivadeneira, E y Alexandra, P. 2008. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha: Escuela Politécnica del Ejército Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ciencias Agropecuarias. Trabajo de tesis. 177 p.
- Bedolla, C. y Castañeda, V. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. REDVET. VIII (9): 3-17.
- Calderón, V. 2007. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el Altiplano Cundiboyacense. Rev. Colom. Cienc. Pecu. 24(1):19-28.
- Chávez, E., Rojas, J., Rivera, P. y Hernández, F. 2000. Prevalencia de cepas de *Staphylococcus* productoras de biopelículas y con receptores FC aislados de muestras clínicas y de individuos sanos. Rev. Costarric. Cienc. Med. 21:51-56.
- Farías, J., Valero-Leal, K., D'pool, G., García, A. y Allara, M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. Rev. Cientif. FCV-LUZ. XV (3): 227-234.
- Farías, J., Valero-Leal, K., D'pool, G., García, A., Allara, M. e Izquierdo, P. 2001. Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. Rev. Cientif. FCV-LUZ. XI (6): 479-484.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M. and De Gregório, O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 83: 1224–1227.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Rodriguez, F. y Torres, R. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85:1913-1917.
- Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). 2009. Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada, décima edición Volumen 2 (1). [On line]. http://www.redbioquimicasf.com.ar/redes/whonet/m02_a10_new.pdf. [junio de 2013].
- Kaszanyitzk, Y., Jánosi, S., Egyed, Z., Ágost, G. and Semjén, G. 2003. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and from different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system. Acta Vet. Hung. 51: 451-4654.
- MacFaddin. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial panamericana. Buenos Aires., 3ra Edición. pp. 850.
- Medina, Y. 2000. Prevención y control de mastitis en la unidad de producción bovina

UNELLEZ, Guanare. Aplicación de Conocimientos. Ingeniería en Producción Agrícola Animal – UNELLEZ Guanare. 25p.

National Mastitis Council (NMC). 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. National Mastitis Council. 222 p.

Pellegrino, M., Frola, I. Odierno, L y Bogni, C. 2010. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. Rev. Electrón. vet. 12 (7). [On line]. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711.html>. [marzo de 2014].

Radostits, O., Gay, C., Blood, C. y Hincencliff, K. 2002. Medicina Veterinaria. 9ª Edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana S.A. Madrid, España. pp. 711-79.

Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X. y Olivera, M. 2012. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis. Biosalud 11(2): 40 – 51.

Scaramelli, A. 1999. Diagnóstico microbiológico de la mastitis bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Salud Pública, Cátedra de Microbiología e Inmunidad. Maracay Venezuela. 213 p.

Tikofsky, L. Barlow, J. Santisteban, C. and Schuck-Ken, Y. 2006. Comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic y conservational dairy herds. Microb. Drug. Resist. 9:S39-S45.

Valero, K., Olivares, Y., Perozo, A., Valbuena, E., Boscán, L, Colina, G. y Bríñez, W. 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. Revista Científica, FCV-LUZ / XX (4): 367 – 376.